

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07327698 A**

(43) Date of publication of application: **19.12.95**

(51) Int. Cl

C12Q 1/68

C12N 15/09

G01N 27/447

G01N 33/50

G01N 33/53

(21) Application number: **07112467**

(71) Applicant: **S R L:KK**

(22) Date of filing: **13.04.95**

(72) Inventor: **KUMAGAI MICHIO
SHINDO YUKIKO**

(30) Priority: **13.04.94 JP 06 99243**

(54) METHOD FOR DETECTING VARIATION OF DNA

(57) Abstract:

PURPOSE: To simply detect variation of a DNA in high reliability by annealing a specimen DNA and a comparison DNA to form a hybrid double-stranded DNA, reacting the double-stranded DNA with MutS protein and detecting formation of its bonded material.

CONSTITUTION: A specimen DNA and a comparison DNA are annealed to form their hybrid double-stranded DNA and the prepared hybrid double-stranded DNA is reacted with a MutS protein. The bonded material of the hybrid double-stranded DNA and the MutS protein is subjected to electrophoresis of native polyacrylamide gel to form the band of the bonded material. The band is

dyed by a dyeing method such as dyeing with ethidium bromide to simply detect variation of the specimen DNA in high reliability by a method applicable to a specimen DNA in a wide range. A MutS protein immobilized to a carrier can be used.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-327698

(43)公開日 平成7年(1995)12月19日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/68	A	9453-4B		
C 12 N 15/09	Z NA			
G 01 N 27/447				
	9281-4B		C 12 N 15/00	Z NA A
			G 01 N 27/26	3 1 5 H
		審査請求 未請求 請求項の数 8 FD (全 12 頁) 最終頁に統く		

(21)出願番号 特願平7-112467

(22)出願日 平成7年(1995)4月13日

(31)優先権主張番号 特願平6-99243

(32)優先日 平6(1994)4月13日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 390037006

株式会社エスアールエル
東京都立川市曙町二丁目41番19号

(72)発明者 熊谷 道代

東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア
ールエル八王子ラボラトリ一内

(72)発明者 進藤 由紀子

東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア
ールエル八王子ラボラトリ一内

(74)代理人 弁理士 谷川 英次郎

(54)【発明の名称】 DNAの変異の検出方法

(57)【要約】

【目的】 簡便で、かつ信頼性が高く、従来法よりも広範囲の試料DNAに適用可能なDNAの変異の検出方法を提供すること。

【構成】 試料DNAと対照DNAとをアニールしてこれらのハイブリッド二本鎖DNAを形成させ、得られたハイブリッド二本鎖DNAをM u t Sタンパク質と反応させ、該ハイブリッド二本鎖DNAとM u t Sタンパク質との結合体を検出することにより、試料DNA中の変異を検出することから成る、DNAの変異の検出方法を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料DNAと対照DNAとをアニールしてこれらのハイブリッド二本鎖DNAを形成させ、得られたハイブリッド二本鎖DNAをMut Sタンパク質と反応させ、該ハイブリッド二本鎖DNAとMut Sタンパク質との結合体を検出することにより、試料DNA中の変異を検出することから成る、DNAの変異の検出方法。

【請求項2】 前記ハイブリッド二本鎖DNAとMut Sタンパク質との結合体の検出は、ゲル電気泳動によつて該結合体のバンドを形成させ、このバンドを検出することにより行われる請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記バンドの検出は、バンドを染色することにより行われる請求項2記載の方法。

【請求項4】 前記試料DNA又は前記対照DNAとして標識したDNAを用い、前記バンドの検出は、該標識を検出することにより行われる請求項2記載の方法。

【請求項5】 前記ゲル電気泳動は、ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動である請求項2ないし4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】 試料DNA又は対照DNAとして標識したものを用い、これらをアニールしてこれらのハイブリッド二本鎖DNAを形成させ、これを担体上に不動化されたMut Sタンパク質と反応させ、担体を洗浄後、担体上の前記標識を検出することにより行う請求項1記載の方法。

【請求項7】 試料DNAと対照DNAとをアニールしてこれらのハイブリッド二本鎖を形成させ、これを担体上に不動化されたMut Sタンパク質と反応させ、担体を洗浄後、抗Mut S抗体を作用させ、担体を洗浄後、担体に結合された抗Mut S抗体を検出することにより行う請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記抗Mut S抗体として標識された抗体を用い、担体に結合された抗Mut S抗体の検出は該標識を検出することにより行われる請求項7記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、DNAの変異の検出方法及びDNAの変異領域の塩基配列の決定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年分子生物学が急速な発展を遂げるに従い、様々な疾患が遺伝子の異常に起因することが明らかになってきた。それらは、例えば転座、大規模な欠失等のような染色体レベルでの異常から、点突然変異や、数塩基対の欠失によるフレームシフト等、分子レベルの異常まで、多くの種類が挙げられる。その中でも特に分子レベルの異常は頻度も高く、顕微鏡下での解析が困難であるため、効果的な検出法が広く望まれている。

【0003】 現在点突然変異を検出する方法がいくつか考えられている。それらのうちで最も広く用いられているものは、関谷らによる「一本鎖DNA高次構造多型(single-strand conformation polymorphism; SSCP)解釈法」であるが、これは検出できるDNAの長さが300bp以下であり、結果として現れるパターンも一定ではない、等の欠点を持つ。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、簡便で、かつ信頼性が高く、従来法よりも広範囲の試料DNAに適用可能なDNAの変異の検出方法を提供することである。さらに、本発明の目的は、試料DNAの変異領域の塩基配列を決定する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本願発明者らは、鋭意研究の結果、二本鎖DNAの誤対合(ミスマッチ)部位を特異的に認識してこの部分に結合するMut Sタンパク質を巧妙に利用することにより試料DNA中の変異を検出できることを見出し本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明は、DNAと対照DNAとをアニールしてこれらのハイブリッド二本鎖DNAを形成させ、得られたハイブリッド二本鎖DNAをMut Sタンパク質と反応させ、該ハイブリッド二本鎖DNAとMut Sタンパク質との結合体を検出することにより、試料DNA中の変異を検出することから成る、DNAの変異の検出方法を提供する。また、本発明は、上記本発明の方法において得られるMut Sタンパク質とハイブリッド二本鎖の結合体にMut Lタンパク質を作用させ、次いでDNaseを作用させて、変異部位を含むするDNA領域をMut Lタンパク質及びMut Sタンパク質と共に分離し、該DNA領域をMut Lタンパク質及びMut Sタンパク質から分離した後、その塩基配列を決定する、試料DNA中の変異領域の塩基配列の決定方法を提供する。

【0007】 以下、本発明の方法を詳細に説明する。

【0008】 本発明の方法に適用される試料DNAは、塩基配列が変異しているかを調べたい対象となるDNAであり、通常、遺伝子、特に、その突然変異が遺伝病等の原因となる遺伝子であるがこれに限定されるものではなく、遺伝子以外のDNAであってもよい。また、本発明の方法により検出できる変異は、点突然変異及び1～3ヌクレオチドの欠失等のような小さな変異である。

【0009】 本発明の方法に供される試料DNAは、変異しているか否かを調べようとするいすれのDNAであってもよい。もっとも、検出の感度を高めるために、試料DNAは増幅されたものであることが好ましい。増幅は、遺伝子増幅法(PCR)等の公知の方法により容易に行うことができる。PCRの際に用いるオリゴヌクレオチドプライマーを適当に選択することにより、ゲノム中の所望の領域のみを増幅することができる。すなわ

ち、検査対象がある遺伝病の原因となる遺伝子であれば、その遺伝子又はその中の特定の領域のみをPCRにより増幅して本発明の方法に供する試料DNAとすることができる。

【0010】本発明の方法では、上記試料DNAと、対照DNAとをアニールしてこれらのハイブリッド二本鎖DNAを形成する。ここで用いる対照DNAは、検出すべき変異の部位を除き、試料DNAと相補的な塩基配列を有するものである。例えば、試料DNAが、遺伝病の原因となる遺伝子である場合には、対照DNAとしては、正常な当該遺伝子を用いることができる。試料DNAが増幅されたものである場合には、対照DNAとして増幅されたDNA又は合成DNAを用いることができる。増幅された対照DNAは試料DNAと同様にPCR等により容易に得ることができ、また、対照DNAとして用いることができる合成DNAは、市販のDNA合成機により容易に合成できる。アニールは、試料DNAと対照DNAとを含む溶液を加熱してDNAを変性（一本鎖にすること）し、次いで、この溶液を徐冷することにより行うことができる。この徐冷により、もとの試料DNA及び対照DNAに戻るものも少なくはないが、試料DNAと対照DNAとのハイブリッド二本鎖DNAも形成される。あるいは、PCRを用いる公知の方法により対照DNAを一本鎖のみにして過剰に加え、アニールすることにより、形成された二本鎖のほとんど全てを所望のハイブリッド二本鎖DNAとすることができます。次いで、反応液にS1ヌクレアーゼを作用させることにより、未反応の一本鎖DNAを分解し、DNAとしてほとんどハイブリッド二本鎖DNAのみを含む溶液を得ることができる。もっとも、MutSタンパク質は一本鎖DNAとは反応しないので、S1ヌクレアーゼによる一本鎖DNAの分解は特に必要ではない。

【0011】次いで、このハイブリッド二本鎖DNAとMutSタンパク質を反応させる。これは、上記アニーリング後の溶液からハイブリッド二本鎖DNAを分離することなく行うことができる。MutSタンパク質は、二本鎖DNAの誤対合部分に特異的に結合する。従って、溶液中に存在する試料DNA及び対照DNAにはMutSタンパク質は結合しない。また、試料DNAと対照DNAとが、完全に同一の場合、すなわち、例えば対照DNAが正常遺伝子であり、試料DNAも正常である場合等もMutSタンパク質は結合しない。一方、試料DNA中に変異が存在する場合には、試料DNAと対照DNAとのハイブリッド二本鎖DNA中では、試料DNA中の変異した部位が誤対合となる。従って、この場合にはMutSタンパク質がハイブリッド二本鎖DNAに結合する。よって、MutSタンパク質と二本鎖DNAの結合体を検出することにより、試料DNA中に変異が存在するか否かを知ることができる。

【0012】なお、二本鎖ハイブリッドDNAとMut

Sタンパク質との反応は、特に限定されないが、4～37℃で15～120分間反応させることにより行うことができる。

【0013】なお、ここで用いるMutSタンパク質は、公知のタンパク質であり、その調製方法は例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, pp. 5057-5061, July 1986に記載されているし、また、後述の実施例1にも詳細に記載されている。

【0014】用いるMutSタンパク質は、また、MutSタンパク質の活性が失われない限り、他のタンパク質との融合タンパク質の形態にあってもよい。融合タンパク質の形態にすることにより、誤対合を有する二本鎖DNAとの反応性が、ネイティブのタンパク質よりも高まる場合がある。このような高活性の融合タンパク質を用いると、検出をより高感度に行うことができ、あるいは、同じ感度を達成するのに必要なタンパク量を減らすことができるので好ましい。下記実施例2では、MutSタンパク質の上流にAsn Ser Lys Val Gly Serから成るオリゴペプチド、さらにその上流にラムダファージのNタンパクのN末端から第33番目のアミノ酸までから成るペプチドが結合された融合MutSタンパク質を作製した。この融合MutSタンパク質の、誤対合を有する二本鎖DNAとの結合活性は本願発明者らが作製したネイティブのMutSタンパク質よりも高いことが確認された。

【0015】上記した本発明の方法は、下記のような種々の態様で行うことができる。

【0016】第1の方法では、試料DNAと対照DNAとをそれぞれ遊離状態で溶液中でアニールし、MutSタンパク質をこの溶液に加えて反応させる。次いで、この溶液を電気泳動にかける。電気泳動の操作自体は周知である。電気泳動はネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動により行うことが好ましいがこれに限定されるものではない。MutSタンパク質が結合したDNAは、MutSタンパク質が結合していないDNAと移動度が異なるので、MutSタンパク質が結合していないDNAのバンドとは異なる位置にバンドを形成する。従って、このようなバンドが存在するか否かを調べることにより、MutSタンパク質とDNAの結合体が形成されたか否か、ひいては試料DNA中に変異が存在していたか否かを知ることができる。バンドの検出は、例えばエチジウムプロミド染色のような常法によりバンド中のDNAを染色することにより行うことができる。

【0017】第2の方法では、試料DNA又は対照DNAとして標識したものを用いる。この標識したDNAは、例えば、蛍光標識等により標識したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRを行うことにより容易に調製することができる。あるいは例えば、 γ - 32 P標識したATPとT4ヌクレオチドキナーゼを用いてDNAの末端を標識してもよい。試料DNA及び対照DNAを

50

それぞれ遊離状態で溶液中でアニールした後、担体上に不動化されたMutSタンパク質と反応させる。担体としては、マイクロタイタープレートのウェル、ガラス又はプラスチックビーズ及びニトロセルロースフィルターなどを挙げることができる。担体にタンパク質を不動化する方法は免疫分析の分野において周知であり、単に担体とタンパク質とをインキュベートすることにより行うことができる。なお、MutSタンパク質を不動化後又は不動化する際、DNAの非特異的吸着を防止するためには、スキムミルクやBSA等を反応させて膜をブロッキングしておく。不動化MutSタンパク質と上記アニール後の溶液（ただし、非特異的吸着を防止するためにサケ精子DNA等を添加）を接触させることにより、MutSタンパク質とハイブリッド二本鎖DNAを反応させる。次いで、担体を洗浄後、担体上に存在する標識を検出する。この方法では、ハイブリッドDNAに誤対合が存在する場合、すなわち、試料DNA中に変異が存在する場合にのみDNAが担体にMutSタンパク質を介して結合され、誤対合が存在しないそれ以外のDNAは洗浄操作により担体から除去される。よって、上記操作により担体上に標識が検出された場合には、試料DNA中に変異が存在することを意味し、これにより、試料DNA中の変異を検出することができる。

【0018】第3の方法では、試料DNAと対照DNAとをそれぞれ遊離状態で溶液中でアニールし、これらのハイブリッド二本鎖DNAを形成させ、これを担体に結合する。担体としては、マイクロタイタープレートのウェル、ガラス又はプラスチックビーズ及びニトロセルロースフィルターなどを挙げることができる。担体にDNAを不動化する方法は周知であり、単に担体とDNAとをインキュベートすることにより行うことができる。なお、DNAを不動化後又は不動化する際、タンパク質の非特異的吸着を防止するために、担体を例えばBSA又はスキムミルク等によりブロッキングしておく。次いで、この不動化DNAとMutSタンパク質を反応させ、担体を洗浄後、担体に結合されたMutSタンパク質を検出する。MutSタンパク質の検出は、例えば標識した抗MutSタンパク質抗体を作用させ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。あるいは、MutSタンパク質として標識されたものを用い、該標識を検出することにより行うこともできる。

【0019】第4の方法では、上記第2の方法を、試料DNA又は対照DNAを標識することなく行い、担体上に存在するMutSタンパク質とハイブリッドDNAとの結合体の検出を、MutLタンパク質を用いて行う。MutLタンパク質は、MutSタンパク質と二本鎖DNAとの結合体に特異的に結合するタンパク質である。すなわち、DNA溶液を担体に加えて、反応させ、洗浄した後、MutLタンパク質溶液を担体に加えて反応させる。MutLタンパク質とMutSタンパク質-DNA

A結合体との反応は、特に限定されないが、4~37℃で、10~60分間反応させることにより行うことができる。次いで、洗浄後、担体上に存在するMutLタンパク質を検出する。MutLタンパク質の検出は、抗MutLタンパク質抗体を用いる免疫分析法によても行うことができるし、MutLタンパク質自身を標識しておき、この標識を検出することによっても行うことができる。なお、この方法で用いられるMutLタンパク質自身は公知であり、例えば、THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 264, No. 2, pp. 1000-1004, 1989に記載されている。また、MutLタンパク質の調製方法は下記実施例にも詳細に記載されている。この方法によれば、MutLタンパク質は、MutSタンパク質-DNA結合体に特異的に結合するので、上記操作により担体上にMutLタンパク質が検出されれば、試料DNA中に変異が存在したことがわかる。

【0020】第5の方法では、増幅又は合成した対照DNAを変性して担体上に不動化し、増幅した試料DNAと、担体上に不動化された該一本鎖対照DNAとをアニールする。一本鎖DNAを担体に不動化する方法はこの分野において周知であり、一本鎖DNAと担体をインキュベートすることにより行うことができる。上記アニーリング操作後、担体を洗浄し、次いでMutSタンパク質を作用させ、さらに担体を洗浄後、担体上に存在するMutSタンパク質を検出する。MutSタンパク質の検出は、標識したMutSタンパク質を用い、この標識を検出することによって、あるいは標識抗MutSタンパク質抗体を用いる免疫分析等によって行うことができる。この方法によれば、MutSタンパク質は、誤対合を有する二本鎖DNAと特異的に結合するので、MutSタンパク質が担体上に検出されれば、試料DNA中に変異が存在したことがわかる。この第4の方法は、遺伝病等において、遺伝子の特定の部位（ホットスポット）に変異が高い頻度で起きることがわかっている場合に特に有効である。このような場合には、当該ホットスポットを含む対照DNAを担体に固定しておけばよいからである。

【0021】第6の方法では、前記ハイブリッド二本鎖DNAとMutSタンパク質との結合体をさらにMutLタンパク質と反応させ、得られた結合体をゲル電気泳動にかけて該結合体のバンドを形成させ、このバンドを検出する。このバンドの検出は、上述した、ハイブリッド二本鎖DNAとMutSタンパク質との結合体のバンドを検出する方法と同様に、バンドの染色、標識MutLタンパク質の利用、標識DNAの利用、抗MutLタンパク質を用いたウェスタンプロット法等により行うことができる。

【0022】以上、本発明の種々の態様を記載したが、本発明はこれらに限定されるものではなく、要するにMutSタンパク質-ハイブリッド二本鎖DNA結合体を

検出することにより試料DNA中の変異を検出する方法は全て本発明の範囲に含まれるものである。例えば、MutSタンパク質-ハイブリッド二本鎖DNA結合体をクロマトグラフィーにより分離することも可能であると考えられる。

【0023】試料DNA中に変異が存在する場合に、該変異部位近傍のDNAの塩基配列を知りたい場合がある。本発明は、このような場合の該塩基配列の決定も可能にする。すなわち、上記本発明の方法において、MutSタンパク質-二本鎖DNA結合体にMutLタンパク質を反応させる。この反応条件は上記の通りである。これにより、MutLタンパク質がMutSタンパク質-二本鎖DNA結合体に結合する。この際、MutLタンパク質は、二本鎖DNAの約150bp程度を被覆する。次いで、これにDNaseを作用させ、MutLタンパク質によって被覆されていないDNAを分解する。MutLタンパク質によって被覆されているDNA領域は、DNaseの作用を受けないから分解されずに残る。次いで、この残ったDNA領域をMutSタンパク質及びMutLタンパク質から分離する。これは、反応液中にSDSを加えることにより行うことができる。これにより分離されたDNAを適当なベクターに組み込み、市販のDNAシーケンサーにかけることにより、変異部位を含むDNA領域の塩基配列を決定することができる。なお、MutSタンパク質-二本鎖DNAにDNAaseを作用させても変異部位を含むDNA領域を得ることができるが、MutSタンパク質によって被覆されるDNAはわずか20bp程度であり、これでは短過ぎてその後のクローニング操作が困難である。

【0024】

【発明の効果】本発明の方法では、二本鎖DNAの誤対合部位に特異的に結合するMutSタンパク質を用いるので、信頼性が高く、また、簡便に試料DNA中の変異を検出又は定量することができる。さらに、PCRによる增幅は5000bp位まで可能であるので、従来の方法(300bp)よりもはるかに広範囲の試料DNAに適用することができる。

【0025】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0026】実施例1

(1) MutSタンパク質生産菌の構築(図1)
大腸菌DH5 α 株(Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166:557(1983))よりゲノムDNAを常法により回収した。この大腸菌ゲノムDNAを錠型としてPCRを行い、MutSタンパク質遺伝子を含む2.6kbの断片を複製した。PCRに用いた2種類のオリゴヌクレオチドプライマーの配列はそれぞれ

5' GGATCCATGAGTGCATAGAAAT3'

5' GAATTCTTATTACACCAGGC3'

であった。PCRは市販のキットを用い、添附のマニユアルに従って行った。上記プライマーは、それぞれBamHI部位及びEcoRI部位を有するので、このようにして得られたDNA断片は、5'側にBamHI部位、3'側にEcoRI部位を有する。

【0027】市販のプラスミドベクターであるpGEX-2T(ファルマシア社製)をBamHI及びEcoRIで消化し、上記のようにして得たMutSタンパク質遺伝子断片をpG

10 EX-2Tのマルチクローニング部位に挿入した。得られた組換えベクターをBamHIとPvuIIで消化し、両端にPvuII部位、BamHI部位、中央にXbaI部位、該XbaI部位と下流のBamHI部位の間にリボソーム結合部位(以下、RBS)を有する、図1に示す二本鎖オリゴヌクレオチド断片をこれに挿入した。これをPvuIIとEcoRIで消化し、MutSタンパク質遺伝子を含むDNA断片の両端を平滑末端化した。

【0028】一方、市販のベクターであるpPL- λ (ファルマシア社製)をHpaIで消化し、先に得られた

20 MutSタンパク質を含むDNA断片とライゲートし、組換えベクターpPL λ (mutS)を得た。大腸菌N4830-1株(ファルマシア社)を常法である塩化カルシウム法により、pPL λ (mutS)で形質転換し、薬剤マーカー(アンピシリン耐性)に従って形質転換株を選択し、さらに、調製したプラスミド(pPL λ (mutS))を制限酵素で確認することによりMutSタンパク質高生産菌N4830-1/pPL λ (mutS)を選択した。

【0029】(2) MutSタンパク質の部分精製

N4830-1/pPL λ (mutS)の培養液を遠心し、沈殿した細胞
30 ペーストを公知の方法(PREPARATION OF EXTRACTS FROM PROKARYOTES, Methods in Enzymology, Vol. 182, pp. 1 49-150)によりリゾチームで処理して細胞を溶解した。

得られた細胞溶解物を1時間氷冷した後、37°Cで4分間加温した。次いで23,000gで1時間遠心し、上清に固体の硫酸アンモニウムを最終濃度18%(w/v)又は30%飽和となるよう添加した。沈殿画分を20mM Tris-HCl(pH7.5)に懸濁し、部分精製MutSタンパク質試料とした(タンパク濃度0.3mg/ml)。なお、上記沈殿画分は約3gの大腸菌から4.3mg得られた。得られた

40 MutSタンパク質試料の一部を常法に基づきSDS-PAGEにかけ、クマシープリリアントブルー(CBB)でバンドを染色した。結果を図2に示す。図2に示されるように、N4830-1/pPL λ (mutS)による大量発現物は、分子量的に確かにMutSタンパク質と思われ、また、上記方法により90%以上に部分精製された。

【0030】(3) 部分精製MutSタンパク質の活性確認

上記のようにして部分精製されたMutSタンパク質が、二本鎖DNAのミスマッチ部位に特異的に結合する活性を有しているか否かをゲルシフト法により調べた。

この操作は次のように行った。

【0031】MutSタンパク質の基質となる二本鎖DNAを調製するため、下記の塩基配列を有する2種類の*

5'-GCA TAC GGA AGT TAA ACT GCG GAT CAT CTC TAG CCA-3' (I)

5'-TGG CTA GAG ATG ATC CGC NCT TTA ACT TCC GTA TGC-3' (II)

これらのオリゴヌクレオチドは (I) の下線を引いたTと (II) の下線を引いたNの対合部分を除き、完全に相補的である。(I) と (II) をアニールすると、(I) の下線を引いたTと (II) の下線を引いたNとが対合するが、NがAの場合 (IIc) には (I) と (IIc) は完全に相補的であり、誤対合は生じない。これを対照とした。一方、NをGとしたもの (IIm) 及びNが欠失したもの (Id) も調製し、これらをサンプルとして試験に供した。

(IIm) を用いた場合には、この部分のみに誤対合が生じる(点変異)。(Id) を用いると、(I) 中の対応するTがループ状にはみ出した形で (I) と (Id) がハイブリダイズする(欠失)。なお、これらのオリゴヌクレオチドは、[γ -³²P] ATPとT4ヌクレオチドキナーゼを用いて末端標識した。オリゴヌクレオチド (I) と (IIm)、(Id) 又は (IIc) を分析用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 0.01 mM EDTA) 中で 70 °C で 10 分間加熱し、室温まで冷却し、室温で 30 分間放置することによりアニーリングし、各々二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

【0032】上記MutSタンパク質試料(タンパク量 4.0 pmol(約 4 μ g))と、4 μ lの x 5 分析用緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA)、上記 3.6 bp のDNA試料 12 pmol (300 ng)、d₂Wを混合して全量を 20 μ l とし、30 °C で 20 分間インキュベートした。また、同様に調製した試料を、DNase I (濃度、2.5, 5.0, 1.5.0, 3.0 ng/ μ l) を加えることにより、MutSタンパク質により被覆されていないオリゴヌクレオチドを分解した。100 mM EDTA を加えて反応を停止させた。これらの試料を、ネイティブ PAGE にかけた。ネイティブ PAGE は、各試料を 3 μ l の 6 x LB 緩衝液 (ローディング緩衝液) と共に 20% ポリアクリルアミドゲル (1xTBE) にかけ、20 V/cm の電圧密度で 3 ~ 5 時間電気泳動を行うことにより行った。次いで常法によりゲルをエチジウムプロミドで染色することによってバンドを検出した。また、比較のため、3.6 bp の一本鎖DNAを用いたものについても同様に試験した(この結果は、図3中のレーン「s」に示す)。さらに、比較のため、pPL-λベクターのみを導入した細胞の抽出液をMutSと同様にして調製したものも同様に試験した(この結果は、図3中、右側の「pPL」に記した3本のレーン「m」、「d」、「c」に示す)。

【0033】結果を図3に示す。図3から、(IIm) 又は (Id) を用いた場合には、(IIc) を用いた場合とは異なる位置にバンドが見られ、(IIc) を用いた場合にはこの

*一本鎖オリゴヌクレオチド (I) 及び (II) を市販のDNA合成機により合成した。

5'-GCA TAC GGA AGT TAA ACT GCG GAT CAT CTC TAG CCA-3' (I)

5'-TGG CTA GAG ATG ATC CGC NCT TTA ACT TCC GTA TGC-3' (II)

※位置にはバンドが見られない。また、MutSタンパク質遺伝子を含まない、pPLベクターのみを含む細胞から調製した試料を用いた場合も、同様にこの位置にはバンドが見られない。従って、MutSタンパク質は点

10 変異又は欠失を有する二本鎖オリゴヌクレオチドとのみ結合したことがわかる。また、DNase I で処理した試料についての結果を図4に示す。図4に示されるように、対照である (IIc) を用いた場合には、DNase I の濃度に従ってバンド自体が消滅していくが、(IIm) を用いた場合には、DNase I の濃度を上げるとバンドは低分子量側へシフトした。このことから、MutSタンパク質はミスマッチを有する二本鎖DNAに結合してDNAの一部を被覆し、この被覆された部分がDNAase I による分解から保護されたのに対し、完全に相補的な対照の二本鎖DNAではMutSタンパク質と結合せず、DNase I によってDNAが完全に分解されてしまったことがわかる。以上のことから、上記の方法により得られた部分精製MutSタンパク質は、MutSタンパク質としての活性を有していることが確認された。

【0034】(4) MutSタンパク質の精製

N4830-1/pPL λ (mutS) 培養液 1 リットルを遠心し、上記 (2) と同様にして細胞溶解した。溶解物を遠心し、固体の硫酸アンモニウムを終濃度 18% (w/v) に加えて遠心し、沈殿を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し

30 た。この時のタンパク量 (Bio Rad 社製クマシー試薬により、BSAを標準として測定) は 1376.6 μ g であった。次いで、これを緩衝液 A (20 mM KPO₄, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM 2ME, 0.1 M KCl, pH 7.5) に対して透析し、ヘパリンーセファロースカラム (1 x 13 cm、ファルマシア社製) にかけた。カラムを緩衝液 A で洗浄し、KCl の 0.1 → 1 M 直線勾配で溶出した。これを常法によりネイティブ PAGE にかけ、97 kD のバンドを回収した。この時のタンパク量は 176.5 μ g であった。次いでこれをヒドロキシアパタイトカラム (1.5 x 8.5 cm) にかけ、緩衝液 (20 mM KPO₄, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM 2ME, 0.2 M KCl) でカラムを洗浄した後、リン酸カリウムの 0.02 → 0.2 M 直線勾配で溶出し、ネイティブ PAGE にかけ、97 kD のバンドを回収した。この時のタンパク量は 78.3 μ g であった。

【0035】(5) MutLタンパク質の調製

上記(1)において、PCRに用いるオリゴヌクレオチドプライマーとして

5' TGCCAAACTAAGGAGCATTGATGCC3'

5' CCTTAGGCAGGCTCGCCCTTACTGAT3'

を用い、硫酸アンモニウムの濃度が16% (w/v) 又は28%飽和であることを除き、上記(1)及び(2)と同様にして部分精製MutSタンパク質を得た。また、上記(4)と同様にして精製MutSタンパク質を得る。

【0036】実施例2

(1) 融合MutSタンパク質の調製 (図5)
pPL-λ (ファルマシア社製) ベクターをSma Iで消化し、次いでそのままライゲートすることにより2つのSma I部位に挟まれた領域 (Bam HI部位を含む) を削除した。次いで、このベクターをHpa Iで切断し、図5に示す配列を有する合成オリゴDNAリンカーとアニールし、ライゲートした。この合成オリゴDNAリンカーはAsn Ser Lys Val Gly Serのアミノ酸配列をコードする領域を含み、中央にBam HI部位を有し、パリンドロームになっている。次いで、得られたベクターをBam HIで消化し、一方、実施例1(1)で作製したpPL-λ (mutS) をBam HIで消化し、これらをアニールしてライゲートした。得られたベクター (MutSタンパク質の上流にAsn Ser Lys Val Gly Serから成るオリゴペプチド、さらにその上流にラムダファージのNタンパクのN末端から第33番目のアミノ酸までから成るペプチドが結合された融合MutSタンパク質 (F9と命名) を発現する) で実施例1(1)と同様にして大腸菌N4830-1株 (ファルマシア社製) を形質転換し、形質転換株N4830-1/pPL-λ (F9)を得た。

【0037】(2) F9の部分精製物の調製

実施例1(2)と同様な操作によりF9の部分精製物 (ただし、タンパク濃度は5~10mg/ml)を得た。

【0038】なお、以下、実施例2~5においては全てこのようにして得られたF9部分精製物を用いた。従つて、これらの実施例においてMutSタンパク質とはF9又はF9部分精製物を意味する。

【0039】(3) F9部分精製物の活性確認

(i) 実施例1(3)で得た、³²P標識した二本鎖DNA 0.1pmolと、実施例2(2)で得たF9部分精製物 0.1~1.0μgと、50mMのNaClと、1mMのジチオスレイトール (DTT) と1mMのポリフェニルメタンスルホニルフロリド (PMSF) とを10mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液中に含む溶液 (15μl) を4℃で30~60分間インキュベートし、次いで実施例1(3)と同様に6% PAGE (非変性)にかけた。バンドをオートラジオグラフィーで検出した。

【0040】結果を図6に示す。図6に示されるように、誤対合のある二本鎖DNAを用いた場合にはDNA-MutSタンパク質結合体のバンドが現れ、しかも、用いたMutSタンパク質の量に比例して強くなっている。これに対し、誤対合のないDNAではバンドはほとんど検出されなかった。このことから、F9部分精製物は誤対合を有する二本鎖DNAに特異的に結合すること

がわかる。なお、DNA-MutSタンパク質結合体のバンドは近接した位置に二本現れているが、これは、MutSタンパク質とDNAの結合の仕方に2種類あり、その結合の仕方に応じて移動度が異なるためであると推測される。バンドの数が2本あっても、これらの位置は近接しており、一方、遊離のDNAのバンドは遠く離れているので、バンドが2本現れることは本発明の方法を実施するにあたって何ら障害とはならない。

【0041】(ii) 実施例1(3)で作製した³²P標識二本鎖DNAに、それぞれ非標識のG/T二本鎖DNA、A/T二本鎖DNA又はG/C二本鎖DNAを100x (10pmol)、200x (20pmol)又は300x (30pmol)加えること及びF9部分精製物の量が2.0μgであることを除き、実施例2(3)(i)と同様にPAGEを行い、バンドを検出した。

【0042】結果を図7に示す。図7に示されるように、G/Tの誤対合を有する二本鎖DNAを加えた場合にのみ競合が起き、用量依存的にDNA-MutSタンパク質結合体のバンドの強度が変化した。このことから、MutSタンパク質は誤対合を有する二本鎖DNAと特異的に結合していることがわかる。

【0043】(iii) 上記で確認されたF9部分精製物の活性が、MutSタンパク質によるものであることを確認するため (部分精製物は他のタンパク質を含むので、他のタンパク質の反応である可能性がある) 、硫酸アンモニウム沈殿前のN4830-1/pPL-λ (F9)の溶解物について実施例2(i)と同様な操作を行った。比較のため、pPL-λ (MutSタンパク質遺伝子を含まない) を含む大腸菌N4830-1の溶解物、及びF9部分精製物についても同様な操作を行った。なお、全ての例について総タンパク質量は1.0μgであった。

【0044】結果を図8に示す。図8に示されるように、対照溶菌液ではG/Tの誤対合を有するDNAを用いた場合であってもバンドは検出されなかった。一方、MutSタンパク質溶菌液では、G/Tの誤対合を有するDNAを用いた場合にのみバンドが検出された。このことから、誤対合を有するDNAとの結合はMutSタンパク質による反応によることが確認された。

【0045】実施例3 N-ras遺伝子及びK-ras遺伝子codon12異常 (肺癌、大腸癌等) の診断

ラス遺伝子のcodon12のGGTがGATに点変異したN-ras遺伝子及びGTTに点変異したK-ras遺伝子を本発明の方法により検出した。N-ras遺伝子はPA-1細胞 (大日本製薬から市販、ラス遺伝子は正常型とのヘテロ) から、K-ras遺伝子はSW480細胞 (大日本製薬から市販、ラス遺伝子は異常型のホモ) から常法により全DNAを抽出することにより得た。また、正常DNA (図9及び図10で「N」と記載) は、ヒト胎盤細胞から抽出したDNAを用いた。³²Pで末端標識した試料DNAと正常DNA (配列: N-ras: GTT G

GAGCA GGT GGT GTT G; K-ras: GTT GGA GCT GGT GGC GT A G) とを 10 : 1 の比率で混合し、アニール後、TE 緩衝液でDNA濃度を 50 fmol/μl とした。次いで、このDNA溶液 1 μl と Mut S タンパク質 1 μg とを実施例2に記載した緩衝液（全量 15 μl）中で 0 ℃で 60 分間反応させ、実施例1(3) と同様にして 4% PAGEにかけ、次いでオートラジオグラフィーによりバンドを検出した。また、対照として、Mut S タンパク質を含まない緩衝液と同様に反応させたものについても試験した。

【0046】結果を図9及び図10に示す。図9及び図10から明らかなように、試料DNAがN-ras又はK-rasである場合にのみDNA-Mut S タンパク質結合体のバンドが検出された（なお、N-rasの場合にはバックグラウンドのために正常遺伝子の場合にも細いバンドが検出されたが、バンドの太さが全く異なるので検査に支障は生じない）。このことから、本発明の方法により、異常遺伝子の検出が行えることが明らかになった。

【0047】実施例4

ニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell社製 BA 85) を 10 mM HEPES (pH 8.0) に浸漬し、Mut S タンパク質を 1~5 μg フィルターに載せた。5%スキムミルク、10 mM HEPES (pH 8.0) で 4℃で 30 分間ブロッキングを行なった。次いで、実施例1(3) で用いた T/G 又は T/A の対合部分を有する³²P標識DNA 2 pmol を含む結合緩衝液 (0.25%スキムミルク、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、10 mM HEPES (pH 8.0)、1 mM DTT 及びサケ精子DNA 100 μg/ml) 0.5 ml をフィルターに加え、4℃で 1 時間反応させた。次いで、膜を該結合緩衝液で 3 回洗浄し、オートラジオグラフィーにかけた。結果を図11に示す。図11に示されるように、T/G の誤対合を有するDNAの場合にのみオートラジオグラフィーで検出された。よって、この方法でDNAの点変異を検出できることが確認された。

【0048】実施例5

実施例1(3) で用いた T/G 又は T/A の対合部分を有する³²P標識DNA 5 pmol 又は 10 pmol をニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell社製 BA 85) にのせ、5%スキムミルク、0.5 x PBS で室温で 1 時間ブロッキングした。0.5 x PBS で洗浄後、Mut S タンパク質約 5 μg を 0.5 ml の 0.5 x PBS に入れ、フィルターと共に 4℃、1 時間インキュベートした。0.5 x PBS で 3 回洗浄した。一方、F9 部分精製物を常法によりウサギに免疫して得た抗血清から常法によりポリクローナル抗体を調製した。この抗Mut S タンパク質ウサギ抗体 1 μl と、BSA 1 mg を 0.5 x PBS に溶解した溶液 2 ml にフィルター

を入れ、室温で 1 時間反応させた。0.5 x PBS / 0.05% Tween 20 (登録商標) で 3 回洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識した抗ウサギ免疫グロブリンヤギ抗体を反応させ（室温、1 時間）、0.5 x PBS で 3 回洗浄し、市販のペルオキシダーゼ検出キット（コニカイムノステイン HRP-1000）を用いてフィルターに結合された HRP を測定した。

【0049】結果を図12に示す。図12から明らかなように、G/T の誤対合を有するDNAのみが検出され、検出された色素の強度は試料DNAの量に依存していた。このことから、この方法によりDNAの変異が検出できることが確認された。

【0050】実施例6 K-ras 遺伝子codon12 異常（肺癌、大腸癌等）の診断

K-ras 遺伝子について正常型のホモであることがわかつているヒトからリンパ球を回収し、常法によりゲノムDNAを回収する。一方、癌患者及び健常人からも同様にしてゲノムDNAを回収する。これらのゲノムDNAを

20 錫型として用い、オリゴヌクレオチドプライマーとして、

5' AGGCCTGCTGAAATGACTGA3'

5' TTGTTGGATCATATTCGTCC3'

を用い、市販のPCRキットを用いてPCRを行い（PCR条件：95℃ 3分；(95℃、90秒；55℃、1分；72℃、1分) × 35回；72℃、6分）、K-ras 遺伝子を含む断片を調製する。正常型のホモであることがわかつているヒトから調製されたDNA断片を対照DNAとして用いる。対照DNAを [γ -³²P] A

30 TP で末端標識し、各試料DNAと緩衝液中で混合し（対照DNA 0.5~1 pmol/μl と試料DNA 50~100 fmol/μl）、70℃で 10 分間インキュベートすることにより変性する。次いで、30 分以上室温放置することによりアニーリングし、ハイブリッド二本鎖DNAを生成させる。アニーリング後の溶液 1 μl に、上記(4) で精製したMut S タンパク質を 70 μg/ml の濃度に加え、0℃で 30 分間反応させる。これを 4~6%ポリアクリルアミドゲルを用いたネイティプ PAGEにかける。一方、対照として、上記対照DNAを上記の通り Mut S タンパク質と反応させ、この反応液も同様にネイティプ PAGEにかける。バンドをエチジウムプロミドで染色し、バンドの位置を比較する。K-ras codon12 に異常のある患者の場合には、検出されたバンドの位置が、対照のバンドの位置と異なっている。健常人の場合、正常型のホモ接合であれば対照と同じ位置にのみバンドが検出される。また、正常型と異常型のヘテロ接合の場合には、対照の位置と同じ位置と異なった位置にそれぞれバンドが検出される。

【0051】実施例7

50 ピオチンでプライマーを標識することを除き、実施例6

と同様にしてPCRにより各試料及び対照DNAを増幅する。増幅した各試料DNAと対照DNAとを実施例6と同様にしてアニーリングし、標識ハイブリッド二本鎖DNAを得る。一方、MutSタンパク質を緩衝液中に5μg/mlの濃度に溶解し、この溶液を96穴マイクロタイタープレートのウェルに入れ、4℃で1昼夜インキュベートする。市販のブロッキング剤で非特異的吸着部位をブロッキングし、洗浄後、上記標識ハイブリッド二本鎖DNA溶液（濃度：5pmol/ml）をウェルに入れ、4℃で60分間インキュベートする。ウェルを洗浄後、蛍光標識したストレプトアビシン（濃度：0.5μg/ml）を加え、25℃で30分間インキュベートする。次いで、洗浄後、蛍光を測定する。試料が正常型のホモの場合には蛍光は測定されず、K-ras codon12に異常のある患者の場合には蛍光が測定される。

【0052】実施例8

実施例5に記載の方法に準じ、抗MutLタンパク質ウサギ抗体を調製する。実施例7の方法において、DNA試料として標識していないものを採用し、かつ、上記ハイブリッド二本鎖DNA溶液をウェルに入れ、洗浄した後、5μg/mlのMutLタンパク質を加え、4℃で60分間インキュベートする。次いで、上記抗MutLタンパク質ウサギ抗体（濃度：0.5mg/ml）をウェルに入れ、25℃で120分間反応させる。ウェルを洗浄後、蛍光標識した抗ウサギIgG抗体を反応させ（反応条件：25℃、1時間）、洗浄後、蛍光を測定する。実施例7と同様な結果が得られる。

【0053】実施例9

MutLタンパク質として¹²⁵Iで標識したMutLタンパク質を用いることを除き、実施例8と同様な操作を行う。実施例8と同様な結果が得られる。

【0054】実施例10

実施例6と同様にして増幅した対照DNAの溶液（DNA濃度：5μg/ml）を70℃に加熱して変性し、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに入れ、架橋剤を用いてプレート表面に共有結合することにより一本鎖対照DNAをウェルに不動化する。次いで、実施例1と同様にして増幅した試料DNA溶液（DNA濃度：0.5μg/ml）を同様に変性してウェルに入れ、室温まで放冷する。ウェルを洗浄後、MutSタンパク質の溶液（濃度：0.5mg/ml）を入れ、25℃で120分間インキュベートする。ウェルを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した抗MutSタンパク質ポリクローナル抗体溶液を加え、25℃で120分間インキュベート後、洗浄し、オルトフェニレンジアミン溶液を加えて発色させ、硫酸を加えて発色反応を停止し、492nmにおける吸光度を測定する。試料が正常型のホモ場合には発色は測定されず、K-ras codon12に異常のある患者の場合には発色が測定される。

【0055】実施例11

MutSタンパク質としてペルオキシダーゼ標識したMutSタンパク質を用い、上記標識抗MutSタンパク質抗体を用いないことを除き実施例10と同様な操作を行う。実施例10と同様な結果が得られる。

【0056】実施例12

ビオチンでプライマーを標識することを除き、実施例1と同様にしてPCRにより各試料及び対照DNAを増幅する。増幅した各試料DNAと対照DNAとを実施例1と同様にしてアニーリングし、標識ハイブリッド二本鎖DNAを得る。この標識ハイブリッド二本鎖DNAを実施例6と同様にしてMutSタンパク質と反応させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。蛍光標識したストレプトアビシンを用いて実施例7と同様にビオチン標識を検出することにより、バンドを検出し、バンドの位置を比較する。K-ras codon12に異常のある患者の場合には、検出されたバンドの位置が、対照のバンドの位置と異なっている。健常人の場合、正常型のホモ接合であれば対照と同じ位置にのみバンドが検出される。また、正常型と異常型のヘテロ接合の場合には、対照の位置と同じ位置と異なった位置にそれぞれバンドが検出される。

【0057】実施例13

実施例6において、異常型のバンドからMutSタンパク質と二本鎖ハイブリッドDNAとの結合体をポリアクリルアミドゲルと共に切り出し、1%SDS溶液を加えて粉碎することにより抽出し、MutSタンパク質-DNA結合体からDNAを解離させ、これをフェノールクロロホルム抽出することによりDNAを回収する。回収したDNAを市販のクローニングベクターでクローニング後、市販のDNAシークエンサーにかけ、塩基配列を決定する。その結果、異常型の遺伝子の塩基配列と同じ配列が決定される。

【図面の簡単な説明】

【図1】MutSタンパク質生産菌を構築するために調製した組換えベクターの調製方法を示す図である。

【図2】部分精製したMutSタンパク質のSDS-PAGEの結果を示す模式図である。

【図3】部分精製したMutSタンパク質がMutSタンパク質活性を有するか否かを調べたネイティブPAGEの結果を示す模式図である。

【図4】部分精製したMutSタンパク質と各種二本鎖オリゴヌクレオチドとの反応物を種々の濃度のDNase Iで処理したものをネイティブPAGEにかけた結果を示す模式図である。

【図5】MutSタンパク質を含む融合タンパク質であるF9を作製する方法を示す図である。

【図6】MutSタンパク質を含む融合タンパク質であるF9を用いて行った本発明の方法により得られた電気泳動パターンの模式図である。

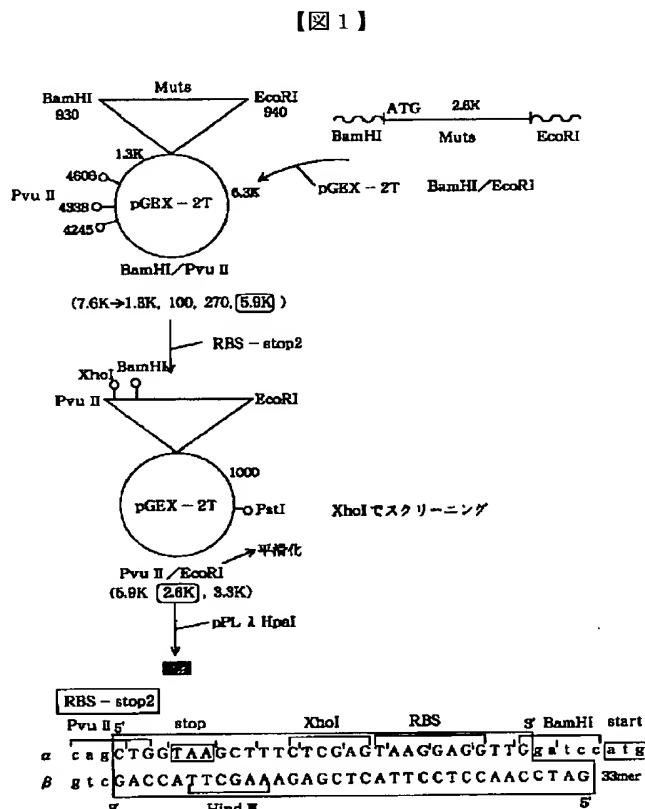
【図7】MutSタンパク質を含む融合タンパク質であ

るF9を用いて行った競合試験の結果を示す電気泳動パターンの模式図である。

【図8】MutSタンパク質を含む融合タンパク質であるF9生産菌の溶菌液を用いて行った試験の結果を示す電気泳動パターンの模式図である。

【図9】本発明の方法によりN-ras遺伝子を検出した結果を示す電気泳動パターンの模式図である。

【図10】本発明の方法によりK-ras遺伝子を検出*

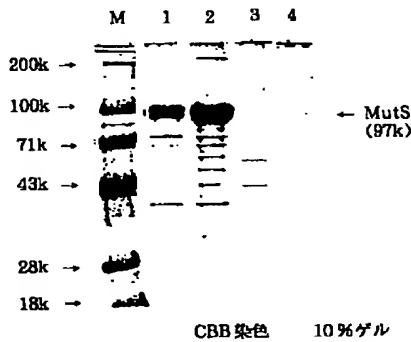


*した結果を示す電気泳動パターンの模式図である。

【図11】本発明の方法により誤対合を有する二本鎖DNAを検出した結果を示すオートラジオグラフィーの模式図である。

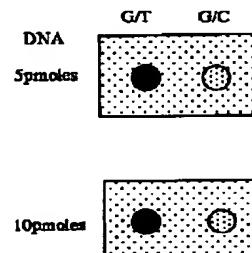
【図12】本発明の方法により誤対合を有する二本鎖DNAを酵素免疫分析により検出した結果を示す模式図である。

【図2】

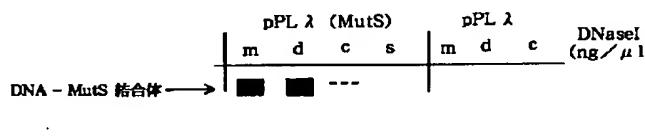


レーンM: マーカー
レーン1: N4830 pPL λ (MutS) タンパク画分x1
レーン2: N4830 pPL λ (MutS) タンパク画分x4
レーン3: BMH71-18MutS
レーン4: N4830 pPL λ

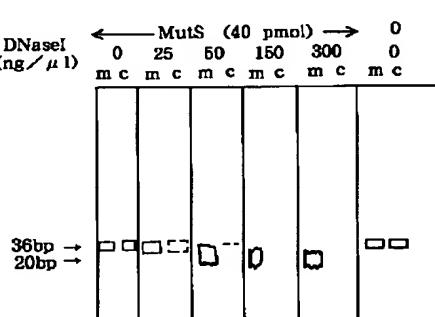
【図12】



【図3】

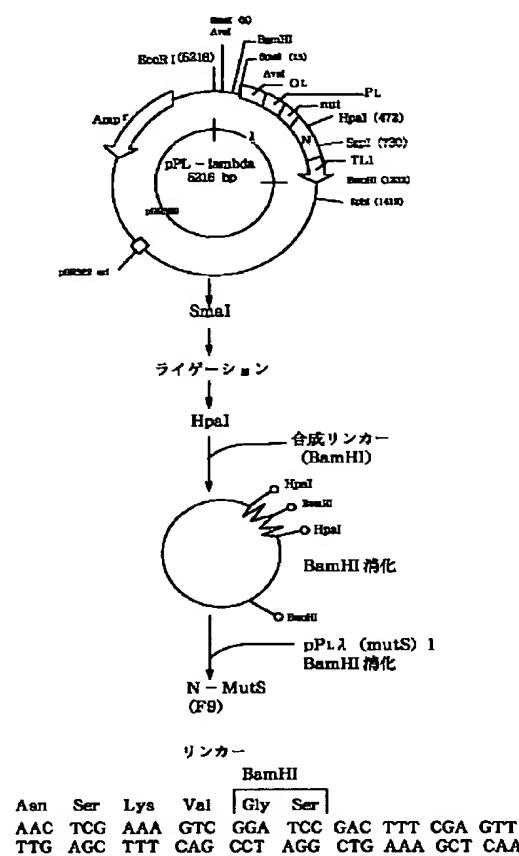


【図4】

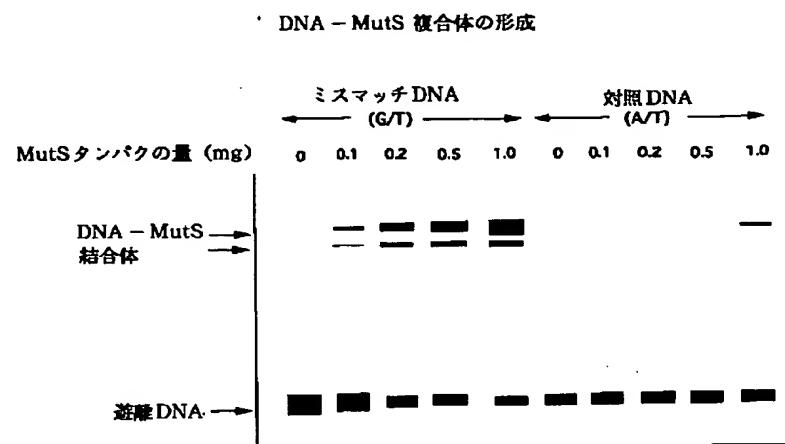


フィルター上のDNAにMutSを反応させ抗MutS抗体で検出した

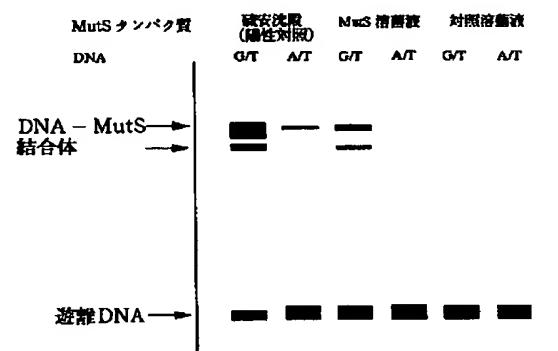
【図5】



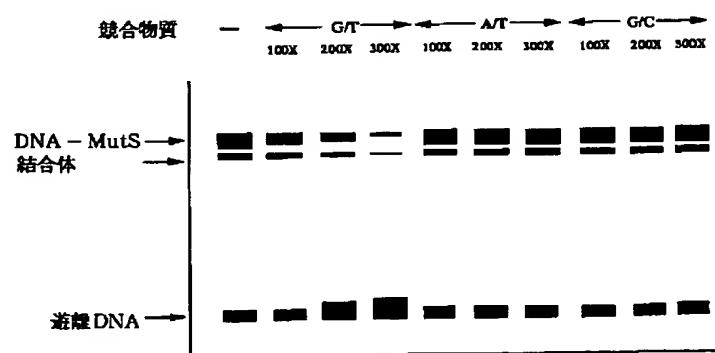
【図6】



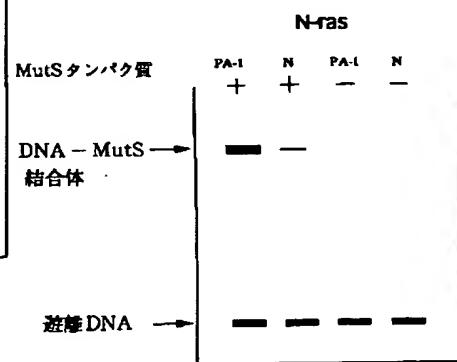
【図8】



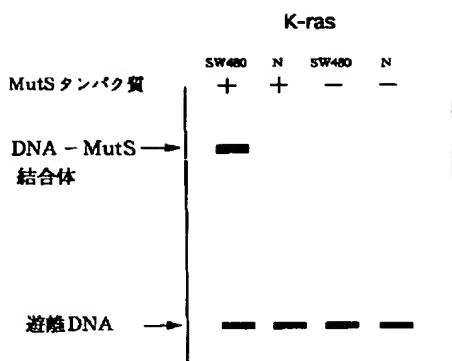
【図7】



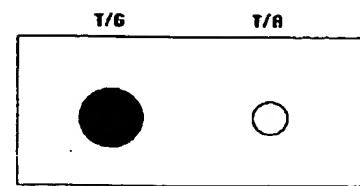
【図9】



【図10】



【図11】



フィルター上に不動化したMutS 蛋白質に標識DNA
を反応させオートラディオグラフィーで検出した

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

G 0 1 N 33/50
33/53

識別記号 P
府内整理番号 M

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 27/26

3 1 5 Z